

ISTITUTO DI ANATOMIA COMPARATA DELL' UNIVERSITÀ DI PAVIA
(DIRETTORE PROF. M. VIALLI)

LABORATORIO MEDICO-MICROGRAFICO DELLA PROVINCIA DI PAVIA
(DIRETTORE PROF. L. BIANCHI)

Dr. Mario Pavan - Dr. Attilio Nascimbene

STUDI SUGLI ANTIBIOTICI DI ORIGINE ANIMALE

IX° - Sui rapporti fra estratti di *Formicidae*, acido formico
e alcuni formiati

Riassunto — Le prove di antibiosi di estratti di *Formica rufa pratensis* e *Dendrolasius fuliginosus* paragonate con quelle di soluzioni definite di acido formico, hanno servito a porre in evidenza la parte sostenuta da questo acido presente nel veleno delle formiche suddette e nei relativi estratti. Prove di allontanamento dell'acido formico hanno posto in evidenza che l'azione antibatterica di estratti acquosi di *F. r. pratensis* è dovuta esclusivamente alla presenza dell'acido, mentre gli estratti eteri di *D. fuliginosus* e *Lasius bicornius affinis* conservavano una netta attività antibatterica che viene studiata in altre note.

Nel corso delle nostre ricerche sugli antibiotici di origine animale abbiamo preso in considerazione varie specie di formiche, sulle quali riferiamo in apposite note. Il lavoro che abbiamo svolto su tali imenotteri ha messo in evidenza la costante azione antibiotica degli estratti di quelle specie che risultavano produttrici di acido formico.

Sia da un punto di vista naturalistico teorico, sia per le eventuali prospettive pratiche della nostra ricerca l'azione antibatterica dell'acido formico del veleno delle formiche si presentava meno interessante rispetto ad eventuali altri principi antibiotici non conosciuti. Per questo motivo abbiamo fatto qualche ricerca per chiarire la parte di azione antibiotica dovuta all'acido formico presente nei nostri estratti ed eventualmente allontanarlo od isolarne l'azione, e rendere possibile l'identificazione di altri principi coesistenti negli estratti stessi.

Per ottenere questo risultato abbiamo fatto numerose prove ⁽¹⁾ intese a rilevare l'azione antibatterica dell'acido formico in soluzione acquosa, il quale, con la tecnica batteriologica esposta nella nota [9], ci è risultato decisamente attivo fino ad una diluizione di 1-0,66 %, corrispondente ad un pH = 2 circa. Diluizioni progressive fino a 0,02 %, corrispondente a pH = 3, da noi ripetutamente provate, sono risultate costantemente inattive.

Stabilita così per l'acido formico la percentuale minima che secondo la tecnica da noi impiegata risultava ancora attiva, abbiamo condotto una serie di prove per verificare se alcuni dei formiati inorganici più diffusi e un formiato organico, potessero esplicare una qualche azione antibatterica in vitro. In questa serie di esperimenti abbiamo provato soluzioni acquose a varie diluizioni di formiato di sodio, potassio, calcio, magnesio, ammonio, e soluzioni cloroformiche di formiato di amile.

I risultati sono stati costantemente negativi anche alla concentrazione massima del 10 % da noi sperimentata per tutti i prodotti su citati.

Chiariti questi punti, ci siamo pure preoccupati di rintracciare quegli elementi bibliografici che potevano essere di aiuto alle nostre indagini, in merito alla presenza e relativa percentuale di acido formico contenuto nel veleno delle formiche. Stumper (1922 b) riferisce che in *Formica rufa pratensis* Retz l'acido formico contenuto nel veleno corrisponde al 12,5 % del peso dell'animale. Questo dato viene ripreso da Faust (1924), Pawlowsky (1927), Stitz (1936), Maass (1937) e da altri AA.

Lo stesso Stumper (1922 b) afferma che la quantità di acido formico nel veleno di *Dendrolasius fuliginosus* Latr. equivale al 2,3 % del peso corporeo, dato che poi viene riportato da altri AA.

Nei riguardi della percentuale di acido formico presente nelle varie specie di formiche è da rilevare che si ha una grande variabilità in dipendenza di vari fattori ambientali, trofici e stagionali, cosa che del resto risulta evidente anche in Stumper

(1) Sui seguenti schizomiceti: *Vibrio comma* (Schroeter) Bergey, *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ceppo Oxford), *Brucella melitensis* (Hughes) Meyer e Shaw, *Brucella abortus* (Schmidt e Weis) Meyer e Shaw, *Brucella suis* Huddleson, *Escherichia coli* (Migula) Castellani e Chalmers, *Salmonella paratyphi* (B) (Kayser) Bergey, *Eberthella typhosa* (Zopf) Weldin, *Shigella paradysenteriae* (Collins) Weldin, *Mycobacterium phlei* Lehmann e Neumann.

(1922 a), il quale, seguito da vari AA. afferma che la concentrazione di acido formico nel veleno di *F. rufa* varia dal 21,35 al 72,80%.

Noi stessi ci siamo ripetutamente resi conto di questa grande variabilità con diverse specie di *Formicidae*, i cui estratti acquosi manifestano talora fortissima talora debolissima attività antibiotica, pur essendo ottenuti con identica modalità e concentrazione.

Procedendo con precauzione nel trattamento di un lotto di *D. fuliginosus* in modo che le varie fasi di manipolazione degli animali vivi non li disturbassero al punto da provocare l'emissione del veleno, nel dicembre 1947 abbiamo potuto fare un estratto acquoso di addomi, calcolando le diluizioni in modo da avvicinarci teoricamente ad una percentuale di acido formico del 2,3% corrispondente al dato di Stumper. Tale estratto saggiato sugli schizomiceti precedentemente elencati ha dato valori di inibizione notevole, corrispondenti a quelli che si ottengono con una soluzione acquosa di acido formico al 2%. Ammettendo l'azione dell'estratto come dovuta all'acido formico, questo dato comparativo ci pare interessante perchè il valore dell'azione antibatterica ottenuta dall'estratto mise in evidenza la corrispondenza fra il dato 2% da noi indirettamente ottenuto e quello del 2,3% trovato per via sperimentale diretta da Stumper su questa specie di *Dendrolasius*.

Nello stesso tempo questa prova, mentre avvalorava il dato di Stumper, ci ha indotto a credere che l'azione antibatterica dell'estratto acquoso di addomi fosse dovuta all'acido formico del veleno.

Analogo problema si presentava per tutte le altre specie di formiche produttrici di acido formico, da noi trattate, ma per buona parte di esse non ci è stato possibile ripetere le prove comparative ora esposte, e precisamente per le specie: subfam. MYRMICINAE: *Crematogaster scutellaris* Oliv. (1); subfam.

(1) Stumper (1922 b), riferendo l'analisi negativa per l'acido formico fatta su specie di MYRMICINAE, afferma che questa subfamiglia praticamente non produce acido formico. In una nostra analisi di estratti di *Crematogaster scutellaris scutellaris* abbiamo invece trovato acido formico in proporzioni nettamente rilevabili.

FORMICINAE: *Lasius niger* Latr., *Lasius alienus* Foerst, *Lasius niger* × *alienus*, *Lasius bicornis affinis* Sch..

Abbiamo invece potuto ripetere e completare le prove su esposte con *F. r. pratensis*, in estratto acquoso di soli addomi. Per questa specie Stumper (1922 b) afferma che la quantità di acido formico presente nel veleno corrisponde al 12,5% del peso corporeo. Partendo dal presupposto che tale dato di Stumper fosse senz'altro riferibile alla *F. r. pratensis* nelle nostre condizioni di allevamento sperimentale, facemmo un estratto acquoso dell'addome, calcolando le diluizioni in modo tale che l'estratto avrebbe dovuto avere una percentuale di acido formico pari al 6%, secondo i dati riferiti da Stumper. Parallelamente preparammo una soluzione acquosa di acido formico al 6%. Saggiati l'estratto e la soluzione, riscontrammo che quest'ultima esplicava un'azione antibatterica esattamente corrispondente a quella dell'estratto.

A questo punto rimaneva ancora il dubbio che l'azione dell'estratto non fosse dovuta essenzialmente all'acido formico; pertanto, per avere una controprova, abbiamo allontanato l'acido mediante ebollizione dell'estratto a 100°, per parecchio tempo dopo che non si avvertiva più il tipico odore dell'acido formico, riscontrando che in seguito a questo trattamento l'estratto perdeva ogni attività antibatterica.

Come già abbiamo sommariamente esposto nella nota [5], a questo punto si poteva supporre che nell'estratto fosse eventualmente presente un principio antibiotico labile alla temperatura di 100°, e perciò con un'altra porzione dello stesso estratto acquoso abbiamo provocato l'allontanamento dell'acido formico mediante prolungato soggiorno in termostato a 37°, riscontrando che anche in questo caso l'estratto perdeva ogni attività.

Per quanto sia possibile supporre ulteriormente l'esistenza di un antibiotico idrosolubile, labile anche alla temperatura cui abbiamo condotto quest'ultimo esperimento, noi abbiamo ritenuto che il risultato delle due prove di allontanamento dell'acido, in concomitanza con i risultati comparativi dell'estratto originario e della soluzione di acido formico al 6%, fossero sufficienti per attribuire all'acido l'attività dell'estratto.

Nella considerazione che effettuando estratti con un solvente dei lipidi si potessero rilevare principi antibiotici non idrosolubili, abbiamo trattato con etere etilico alcuni lotti di *F. r.*

pratensis, di *D. fuliginosus* e *L. b. affinis*, ottenendo un estratto contenente anche l'acido formico del veleno di queste specie.

Allo scopo di smascherare eventuali principi antibiotici diversi dall'acido formico, abbiamo sottoposto tali estratti eteri totali a completa evaporazione dell'etere, ottenendo un residuo oleoso ricco di acido formico. Sciolto tale residuo in cloroformio si è proceduto a ripetuto lavaggio con acqua bidistillata fino a quando questa non acquistava più alcuna traccia di acidità. Quindi procedemmo alla completa evaporazione del cloroformio, con il risultato che si otteneva un residuo oleoso privo di acido formico e che per *F. r. pratensis* risultava inattivo, mentre per *D. fuliginosus* e *L. b. affinis* manifestava una netta attività antibiotica.

Questo procedimento ci ha messo sulla traccia di due principi antibiotici non noti e di cui siamo riusciti a localizzare la sede nella testa, come abbiamo esposto brevemente nella nota [6]

*
*
*

Con questa nota preliminare sulle nostre ricerche intorno alle sostanze antibiotiche delle formiche produttrici di acido formico, abbiamo inteso mettere in luce alcuni e tipici problemi che abbiamo incontrato nel corso delle nostre indagini, in relazione alla presenza dell'acido in tali specie di Imenotteri.

La tecnica che abbiamo seguito per rilevare e isolare l'azione dell'acido da quella di altri principi attivi, per quanto condotta con mezzi modesti, è stata sufficiente in alcuni casi per appurare che l'azione antibiotica degli estratti era dovuta all'acido formico (*F. r. pratensis*, addommi di *D. fuliginosus*) in altri casi per dimostrare la contemporanea presenza nell'estratto di un principio antibiotico diverso dall'acido formico (estratto totale di *D. fuliginosus* e di *L. b. affinis*).

A termine di queste osservazioni è però da notare che il problema del veleno delle formiche non si risolve in uno studio del solo acido formico, in quanto questo non è che un costituente — anche se in proporzione prevalente — del veleno stesso. Si sa ad esempio che il veleno delle formiche contiene $C_{11}H_{24}$ e una tossialbumina (Lewin e Pouchet, 1903), sostanze delle quali non conosciamo il significato dal punto di vista batteriologico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] PAVAN M. 1948 - Sulla valutazione dell'attività di antibiotici su terreni solidi. - Atti Soc. It. Sc. Nat. **78**, 68.
- [2] PAVAN M. 1948 - Proposte per un metodo di valutazione delle inibizioni da antibiotici su terreni solidi. (In stampa).
- [3] PAVAN M. e NASCIMBENE A. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. I° - Su un principio antibiotico di *Iridomyrmex pruinosus humilis* Mayr. (Nota preventiva). - Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 193.
- [4] NASCIMBENE A. e PAVAN M. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. II°. - Ricerche su alcune Formicidae ad acido formico. (Nota preventiva). - Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 199.
- [5] NASCIMBENE A. e PAVAN M. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. III°. - Sul significato dell'acido formico in estratti acquosi ad azione antibatterica di alcuni Formicidae. (Nota preventiva). Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 203.
- [6] PAVAN M. e NASCIMBENE A. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. IV°. - Sulla presenza di sostanze antibiotiche nella testa di *Dendrolasius fuliginosus* Latr. e *Lasius bicornis affinis* Sch. (Nota preventiva). - Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 207.
- [7] NASCIMBENE A. e PAVAN M. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale V°. - Prime ricerche su Hymenoptera Sphegidae e Vespidae. (Nota preventiva). - Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 211.
- [8] PAVAN M. e NASCIMBENE A. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. VI°. - Riassunto dello studio di 40 specie animali, 17 delle quali con risultati positivi. (Nota preventiva). - Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia, fasc. 1-2, pag. 229.
- [9] PAVAN M. e NASCIMBENE A. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. VII°. - Ricerche su *Iridomyrmex pruinosus humilis* Mayr. - Igiene e Sanità Pubblica, Salerno, IV, 3-4, pag. 129 - 141.
- [10] PAVAN M. e NASCIMBENE A. 1948 - Studi sugli antibiotici di origine animale. - VIII°. - Ricerche su varie specie di Formicidae produttrici di acido formico. (in stampa).
- [11] FAUST E. S. 1924 - Tierische Gifte, pag. 1748-1931 in: Hefter A. Handuch der exper. Pharmakologie, **2**°, 2; Springer, Berlin.
- [12] LEWIN L. e POUCHET G. 1903 - Traité de toxicologie. - 959 pag.
- [13] MAASS Th. A. 1937 - Gift Tiere, Tabulae biologicae XIII°, Junk, pag. 1-272
- [14] PAWLOWSKY E. N. 1927 - Gifttiere; Fischer, Jena, pagg. VII + 516.
- [15] STITZ H. 1936 - Formicidae - Tabulae biologicae periodicae V°. (Tabulae biologicae XI); Junk, pag. 208-272.
- [16] STUMPER R. 1922 a) C. R. Acc. Sc., Paris, CLXXIV, pag. 66.
- [17] — 1922 b) id. id. , pag. 413
- [18] — 1923 id. id. CLXXVI, pag. 330